

PCT/KR 03/02415

RO/KR 19.11.2003

REC'D 02 DEC 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

BEST AVAILABLE COPY

출원 번호 : 10-2003-0024776  
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 04월 18일  
Date of Application

출원 인 : 학교법인고려중앙학원  
Applicant(s) KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION

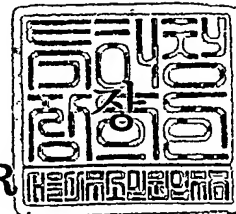
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 11 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0005
【제출일자】	2003.04.18
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터
【발명의 영문명칭】	Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter
【출원인】	
【명칭】	학교법인 고려중앙학원
【출원인코드】	2-1995-276862-2
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	2002-018861-4
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2002-018862-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서미정
【성명의 영문표기】	SUH, Mi Chung
【주민등록번호】	650409-2017619
【우편번호】	143-761
【주소】	서울특별시 광진구 구의3동 현대프라임아파트 13동 1101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김미정
【성명의 영문표기】	KIM, Mi Jung
【주민등록번호】	731030-2841912

**【우편번호】** 134-031  
**【주소】** 서울특별시 강동구 성내1동 467-7  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 정정한  
**【성명의 영문표기】** CHUNG, Chung Han  
**【주민등록번호】** 480229-1018414  
**【우편번호】** 604-081  
**【주소】** 부산광역시 사하구 괴정1동 1065번지 괴정 자유3차아파트 111호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 피재호  
**【성명의 영문표기】** PYEE, Jae Ho  
**【주민등록번호】** 600229-1720922  
**【우편번호】** 435-040  
**【주소】** 경기도 군포시 산본동 목련아파트 1241동 805호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 형남인  
**【성명의 영문표기】** HYUNG, Nam In  
**【주민등록번호】** 620718-1025412  
**【우편번호】** 330-090  
**【주소】** 충청남도 천안시 쌍용동 현대아파트 101동 103호  
**【국적】** KR  
**【우선권주장】**  
**【출원국명】** KR  
**【출원종류】** 특허  
**【출원번호】** 10-2002-0069589  
**【출원일자】** 2002.11.11  
**【증명서류】** 첨부  
**【심사청구】** 청구  
**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**  
**【서열개수】** 3

## 【서열목록의 전자파일】

## 【취지】

## 첨부

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

이영필 (인) 대리인

이해영 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 20 면 20,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 11 항 461,000 원

【합계】 536,000 원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】 281,000 원

## 【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2.우선권증명서류 및 동 번역문\_1통

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은 참깨의 마이크로솜 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈 유전자에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터의 활성 단편, 발현 증가 활성의 인트론(intron) 부위, 이 활성 단편 및/또는 인트론 부위를 포함하는 식물체 종자 특이적 발현 프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로서, 본 발명은 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다.

## 【대표도】

도 4a

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터{Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 참깨 유래 마이크로솜 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase), *Si-FAD2* 유전자의 염기서열(서열번호 1)과 이로부터 연역된 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 프로모터 부위의 염기서열(서열번호 3)을 나타낸 것이다.

도 4a는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터 (pBin*Si-FAD2*-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 4b는 본 발명의 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터가 함유된 바이너리 벡터(pBin*Si-FAD2*-GUS) 혹은 CaMV35S 프로모터가 함유된 바이너리 벡터 (pBI121)로 형질전환된 *Agrobacteria*를 바이너리 벡터내에 존재하는 유전자 특이적 프라이머(primer)를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121으로 형질전환된 *Agrobacteria*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 형질전환된 애기장대를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS를 가진 *Agrobacteria*를 이용하여 애기장대를 형질전환시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 6a은 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 삽입하여 제조된 본 발명의 트랜젠트(transient) 발현 벡터 (p*Si*FAD2-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 7b는 본 발명의 p*Si*FAD2-GUS를 함께의 발달하는 종자에 입자 폭격(particle bombardment) 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 8a는 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈 유전자의 프로모터와 그의 유전자 안에 존재하는 인트론(intron) 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터 (p*Si*W6-P2.4)와 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈 유전자의 프로모터 또는 그 일부를 GUS

유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터들 (pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)를 나타내는 모식도이다.

도 8b는 도 8a의 본 발명의 6종류 바이너리 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)을 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI*를 이용하여 절단한 다음, 전기영동한 사진이다.

도 9는 도 8a의 본 발명의 6종류 바이너리 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)과 pBI121 바이너리 벡터를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들을 보여주는 사진들이다.

도 10은 도 9의 7 종류의 형질전환된 애기장대들의 발달 종자, 종자를 둘러싼 꼬투리, 그리고 종자로부터 나온 어린 식물체에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 11a는 도 9의 7 종류의 형질전환된 애기장대의 발달 종자 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 GUS 효소의 활성(nmol/hr/mg protein)을 조사한 것이다.

도 11b는 도 9의 7종류의 형질전환된 애기장대로부터 수확된 종자를 항생제 (kanamycin, 30  $\mu$ g/ml)가 함유된 배지에서 형질전환체를 선별한 다음, 발아 후 7일째 되는 유식물의 자엽에서 GUS효소의 활성(nmol/hr/mg protein)을 조사한 것이다.

도 12는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈유전자의 프로모터에서 종자특이적발현을 나타내는 프로모터활성단편의 염기서열(서열번호 3의-179 내지-53)을 나타낸 것이다.



## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 9> 본 출원은 대한민국 특허청에 2002년 11월 11일자로 출원된 선 특허출원 (출원번호: 10-2002-0069589)을 우선권 기초로 하는 국내우선권주장 출원이다
- 0> 본 발명은 참깨의 마이크로솜 올레산불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈유전자에서 유래된 식물체종자 특이적발현프로모터의 활성단편, 발현증가활성의 인트론(intron)부위, 이 활성단편 및/또는 인트론부위를 포함하는 식물체종자 특이적발현프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.
- 1> 식물체내의 지방산들은 세포막과 종자 내 저장 오일을 이루는 중요한 구성 성분이다. 특히 마이크로솜 올레산 불포화제는 세포 내 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 존재하여 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)의 *sn*-1 과 *sn*-2 위치에 존재하는 일중 불포화지방산, 올레산(oleic acid)를 이중 불포화 지방산, 리놀레산(linoleic acid)로 전환되는 반응을 촉매하는 효소이다.
- 2> *Arabidopsis*, 페튜니아, 그리고 면화에서 마이크로솜 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으며, *Arabidopsis*는 게놈 상에 이 유전자가 1개, 그 외의 다른 식물체에는 2개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Okuley et al., 1994, Plant Cell; Verwoert et al., 2000, Biochemistry Society Transactions; Pirtie et al., 2001, Biochimica et Biophysica Acta). 특히, 이 유전자가 2개 이상 존재할 경우, 적어도 한 개의 유전자는 종자 오일에 존재

하는 리놀레산(linoleic acid) 생산에 관여하는 것으로 알려졌다. 현재까지 상기 3종류의 식물체로부터 마이크로솜 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으나, 그의 프로모터에 대한 연구는 전 세계적으로 전혀 이루어지지 않았다.

3> 최근에 유전 공학 기술을 이용하여 식물의 형질을 개량시키고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 과정에서 외래의 유용 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키고자 할 때 유전자 발현에 관여하는 프로모터가 요구된다. 이를 위해 종래에는 식물체의 전 조직에서 발현이 유도되는 꽃양배추 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus; CaMV35S) 유전자 유래의 프로모터가 널리 사용되어졌다. 그러나, 이 프로모터는 종자의 특정 조직에만 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다. 또한 종자 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 568-576), 잎과 꽃 (Science, 1990, 250: 931-936), 피경 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 577-587) 등의 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터가 보고되어 졌다. 그러나, 상기 종자 특이적 발현 프로모터도 그 발현 시기가 종자의 전 발달 단계에 주로 발현되는 것으로써 이는 종자의 특정 발달 시기에만 특이적으로 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다.

14> 이에 본 발명자들은 참깨로부터 유래된 마이크로솜 올레산 불포화제가 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 것에 착안하여 그의 게놈유전자 및 프로모터를 클로닝한 후, 프로모터를 바이너리(binary) 벡터 및 트랜전트(transient) 발현벡터에 삽입하여 모델 식물체인 *Arabidopsis* 및 참깨 종자에 도입한 결과, 참깨 유래 마이크로솜 올레산 불포화제 게놈유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 단계 특이적으로 발현시키는 신규프로모터임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

25> 또한, 본 발명자들은 선 특허출원된 종자 특이적 발현프로모터에서 종자 특

이적 발현을 나타내기 위해 필수적인 프로모터 활성 단편에 해당하는 127 bp를 발견하였으며, 참깨 유래 *Si-FAD2* 게놈 유전자에 존재하는 intron을 자신의 프로모터와 함께 사용하였을 때, 종자에서 도입된 유전자의 발현을 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있는 사실을 밝힘으로써, intron의 사용에 의하여 외래 유용 유전자를 대량 발현시킬 수 있는 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 26> 따라서, 본 발명의 목적은 참깨의 마이크로솜 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈 유전자에서 유래된 식물체의 종자 특이적 프로모터에서 종자 특이적 발현을 나타내는데 필수적인 프로모터 활성 단편(127 bp)의 염기서열을 제공하는 것이다.
- 27> 본 발명의 다른 목적은 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 프로모터 하에 도입된 외래 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 인트론(intron)의 염기서열을 제공하는 것이다.
- 28> 본 발명의 다른 목적은 참깨의 *Si-FAD2* 게놈 유전자에서 유래된 식물체의 종자 특이적, 특히 종자발달 단계 특이적으로 발현되는 프로모터를 제공하는 것이다.
- 29> 본 발명의 다른 목적은 위의 식물체 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.
- 30> 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 종자발달단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 경우, 위의 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

## 【발명의 구성 및 작용】

- 31> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 -179 내지 -53의 활성 단편을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공하며, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공한다.
- 32> 상기 서열번호 3의 염기서열은 본 발명에서 처음 클로닝되고 염기서열분석된 종자 특이적으로 발현되는 참깨의 마이크로솜 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈 유전자의 전사 개시 부위로부터 -660 내지 -1 부위의 염기서열에 해당된다. 따라서, 이 서열은 식물체 유전자의 전사 개시 부위 인식을 위한 프로모터의 공통서열인 TATA와 CAAT box를 함유하며 또한 종자 특이적 전사 활성을 조절하는 부위를 포함할 것으로 기대된다. 또한, 서열번호 3의 -179 내지 -53은 본 발명의 식물체의 종자 특이적 프로모터에서 종자 특이적 발현을 나타내는데 필수적인, 즉 결실되면 활성이 현저히 상실되는 프로모터 활성 단편(127bp)의 염기서열에 해당한다.
- 33> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- 34> 바람직하게는, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 인트론, 즉 서열번호 1의 149 내지 1722의 발현증가활성 인트론을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 발현증가활성 인트론이 자신의 프로모터와 함께 사용하였을 때, 종자에서 도입된 외래 유전자의 발현을 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있다.
- 35> 바람직하게는, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터는 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 바

이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으므로, 예컨대, pGA 계열, pCG 계열, pCIT 계열, pGPTV 계열, pBECK2000 계열, BiBAC 계열, 및 pGreen 계열 벡터 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가 가능한 pBI101 (Clontech, 미국)를 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

36> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 바이너리 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 바이너리 벡터 (pBinS/FAD2-GUS)(도 4a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질전환시켰다(실시예 4 참조).

37> 또한, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터에서, 본 발명의 프로모터와 인트론은 바이너리벡터에 함유된 외래유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터유전자인 GUS유전자가 함유된 pBI101에 본 발명의 프로모터 및 인트론을 삽입하여 바이너리 벡터(pSiW6-P2.4)(도 8a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질전환시켰다(실시예 8 참조).

38> 바람직하게는, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터는 상기 프로모터가 트랜전트(transient)발현벡터의 외래유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 트랜전트 발현 벡터는 외래유전자를 도입된 식물체내에서 일시적으로 발현될수 있도록 제작된 어떤 트랜전트발현벡터도 될수 있으므로, 예컨대, pBI221(Mitsuhara et al., 1996), pMG221(Maas et al., 1991), pUbiGUS(Christensen and Quail, 1996), 및 ACT1-D(McElroy et

al., 1990) 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가 가능한 pBI221 (Clonetechn, 미국)을 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에서 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

39> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 트랜전트 발현 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 트랜전트 발현 벡터(pS/FAD2-GUS)(도 7a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 참깨 종자를 형질전환시켰다(실시예 5 참조).

40> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 또는 식물체를 제공한다.

41> 상기 식물체종자 특이적발현벡터가 바이너리벡터인 경우에는 Floral dip방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 따라 식물체를 형질전환시키고, 트랜전트발현벡터인 경우에는 Particle bombardment 방법(Lacorte et al., 1997, Plant Cell Reports)에 따라 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명의 식물체 종자 특이적발현벡터는 쌍자엽 혹은 단자엽 식물, 유성생식 혹은 무성생식 식물에 상관없이 어떤 식물체도 형질전환 시킬수 있으나, 본 발명에서는 그 예로서 *Arabidopsis* 와 참깨(*Sesame indicum* cv.)의 형질전환만을 실시하였다(실시예 4, 5 참조).

2> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공한다.

- 3> 상기 외래 유전자는 식물체에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서 상기 프로모터 또는 인트론의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.
- 4> 본 발명은 식물체 종자 특이적으로 발현이 유도되는 마이크로솜 올레산 불포화제 (microsomal oleic acid desaturase) 게놈 유전자의 종자 특이적 프로모터 및 이 프로모터를 사용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로서, 본 발명은 마이크로솜 올레산 불포화제 게놈 유전자의 프로모터와 형질전환 식물체 제조 방법을 이용하여 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다.
- 45> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- 46> (실시예 1) 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (*Si-FAD2*) 게놈 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석
- 47> 참깨의 종자 특이적 *Si-FAD2* 유전자의 게놈(genomic) 클론을 확보하기 위하여 참깨(*Sesame indicum* cv. 양백)의 어린잎으로부터 genomic DNA를 추출(Dellaporta et al., 1984, in Molecular Biology of Plants)하였다. Jin et al. (2001, Plant Science)에 의해 보고된 cDNA 염기서열에 근거해서 Forward primer W6-1 (5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3')과 Reverse

primer W6-R1 (5'-CGGCTTCAGAACTTGTTCTTGTACCAGA-3')를 제작한 후 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 'PCR'로 약칭함) 방법을 이용하여 참깨 FAD2 (microsomal oleic acid desaturase) 유전자에 대한 게놈 클론을 분리하였다. 분리된 게놈 클론은 pGEM-T 벡터(Promega, 미국)에 클로닝한 후, ABI Bigdye cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, 미국)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 보고되어진 cDNA (GenBank Accession No: AF192486)와 비교하였을 때, cDNA의 5' 말단에 존재하는 9 bases (CGGCACGAG)를 제외한 전 염기서열이 동일한 클론임이 확인되었다. *Si*-FAD2 유전자의 genomic 클론은 coding region에 는 intron이 존재하지 않았으며, 5' untranslated region 내에 1574 base에 해당하는 1개의 큰 intron이 존재하였다. *Si*-FAD2 유전자의 염기서열(서열번호 1)과 이로부터 번역된 아미노산 서열(서열번호 2)을 도면 1에 나타내었다. 붉은 색 글씨의 첫 번째 염기 A는 전사 개시 부위를 나타내며, 이탤릭체로 나타낸 부분(*GT-AG*)은 5'untranslated region 내에 존재하는 intron 부분에 해당한다.

#### 48> (실시예 2) *Si*-FAD2 유전자의 5' upstream region 확보 및 염기서열 분석

49> 참깨의 종자특이적 *Si*-FAD2 프로모터 부위를 클로닝하기 위하여 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 염기서열과 Nde I 제한효소 부위를 이용하여 inverse PCR을 수행하였다. Inverse PCR은 보통 프로모터와 같은 미지의 영역을 탐색하는데 있어서 많이 사용되어지고 있다(Digeon et. al., 1999, Plant Molecular Biology). Inverse PCR을 수행하기 위해 genomic DNA를 Nde I제한효소로 완전히 절단한 뒤, T4 DNA Ligase (BM, 독일)를 이용하여 self ligation을 시켜 이것을 template로 사용하였다. Inverse PCR은 specific한 PCR 산물을 얻기 위해 2단계로 진행이 되는데, 우선 1st PCR을 유전자 특이적 primers (W6-1; 5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3' 과 W6-R6; 5'-GGGGGCACGTTACCTGAAACTTGGAAG-3')를 사용해 얻어진 PCR 산물을 다시 안쪽 primers



(W6-2; 5'-GGCTTTGGGACGAAGACTTCGTCACGCT-3', W6-R7; 5'-CGCGTGAAAGCACTTCTGCGGAAGCGC-3')를 이용해서 2nd PCR을 실시했다. 그 결과 약 750 bases에 해당하는 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region(-660 내지 +90)을 확보하였다. 도 2a는 본 발명의 참깨 유래 microsomal oleic acid desaturase, *Si-FAD2* 계놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것으로서, SiW6F1, SiW6R1, W6R3, W6R5, 그리고 W6R1은 아래 도2(B)에서 사용될 primers의 위치를 나타낸 것이다.

50> 확보된 부위가 정확히 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region인지를 확인하기 위하여 750 bases의 5' 말단 및 *Si-FAD2* genomic 유전자의 염기서열에 근거하여 유전자 특이적인 primers(SiW6F1, SiW6R1, W6R1, W6R3 및 W6R5)를 제작하여 PCR을 수행한 결과, 정확히 약 750 bases에 해당하는 부위가 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream 부위임을 확인하였다. 도 2b는 참깨의 앞으로부터 genomic DNA를 분리하여 도 2a에서 보여지는 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이고, M1, M2는 DNA size 마커이고; 제 1열은 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC3')과 SiW6R1 (5'-CTTGGATCCTTGGAAGGAGAAATCGCGTGAAAGCAC-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 2열은 SiW6F1과 W6R1 (5'-CGGCTTCAGAACTTGTTCTTGTACCAGA-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 3열은 SiW6F1과 W6R5 (5'-GGAGAACGAACGGCTGACGGATCTCTCG-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 4열은 SiW6F1과 W6R3 (5'-GGCTTTGGG ACGAAGACTTCGTCACGCT-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이다. 상기 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region 부위의 염기서열을 분석한 후, 그중 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -660인 프로모터 부위의 염기서열(서열번호 3)을 도면 3에 나타내었다.

51> (실시예 3) *Si-FAD2* 유전자의 전사개시 부위 확인

52>       참깨의 종자특이적 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 부위의 활성을 조사하기 위해서는 이 유전자의 정확한 전사개시 부위가 확인되어야 하므로 cRACE (circular first-strand cDNA-mediated rapid amplification of cDNA ends) 방법 (Maruyama et al., 1995, Nucleic Acid Research)에 의거하여 *Si-FAD2* 유전자의 전사개시 부위를 확인하는 연구가 수행되었다. 수행 과정을 보면 우선 참깨의 종자로부터 전체 RNA를 분리한 후, T4 polynucleotide kinase(TAKARA)에 의해 인산화된 gene specific primer (GGTAGCAGTATGGGGATGGCAGCAGATGGAAGTA)와 역전사 효소 (reverse transcriptase, BM)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, T4 RNA ligase (NEB)를 이용하여 5' 말단과 3' 말단을 연결한다. 이를 주형으로 유전자 특이적 primers (W6-5; 5'-GAAGAACCCCTCCAACGGGTGCC-3'와 W6-R9; 5'-CCGATCACATCGCAAGTGCATACACCTG-3')를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 도면1에서 첫 번째 염기(붉은 색) "A"가 전사 개시 (transcription initiation)부위로 확인되었다.

53> (실시예 4) *Arabidopsis* 형질전환에 의한 *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 활성 분석

54>       *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 발현 양상을 분석하기 위하여 클로닝된 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 및 GUS reporter 유전자를 함유하는 binary 벡터 (pBin*SiFAD2*-GUS)를 제조하였다. 우선 참깨의 게놈 DNA를 주형으로 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC-3')와 SiW6R1 (5'-CTTGGATCCTTGAAGGAGAAATCGCGTGAAAGCAC-3')을 사용하여 PCR을 수행한 결과 *Si-FAD2* 유전자 프로모터 부위(-660 내지 +141)를 획득하였고, 이를 *Hind*III와 *Bam*HI으로 절단한 뒤 상용 binary 벡터인 pBI101 벡터(Cat. # 6017-1, Clontech, 미국)의 *Hind*III와 *Bam*HI 제한효소 부위에 삽입하여 pBin*SiFAD2*-GUS라는 binary vector를 제조하였다. 도 4a는 pBin*SiFAD2*-GUS binary vector를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는  $\beta$ -Glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자(발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, NPTII는 Neomycin Phosphotransferase II를

코딩하는 kanamycin 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다.

55>      상기와 같이 제조된 pBinSiFAD2-GUS의 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Suh et al., 2002, Molecules and Cells)내로의 도입은 Freeze-thaw 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)에 근거하여 수행하였다. *Agrobacteria*를 O.D.=0.5가 되도록 YEP 배지에서 현탁 배양한 후, 20 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 현탁한 다음, pBinSiFAD2-GUS binary vector와 혼합하여 액체질소에 1분간 방치한 후, 37 °C에서 2분간 배양함으로써 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1내로 도입하였다. 도 4b는 도 4a에서 보여지는 pBinSiFAD2-GUS binary 벡터와 CaMV35S 프로모터가 함유된 binary 벡터 pBI121 (Cat. # 6018-1, Clontech, 미국)를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1로 각각 도입한 후, 형질전환된 *Agrobacteria*를 binary vector내에 존재하는 유전자 특이적 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다. M은 DNA size 마커이고; N은 pBI121 binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*와 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물 (negative control)이고; P는 pBin

SiFAD2-GUS binary 벡터를 가진 대장균과 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물 (positive control)이고; SS는 pBinSiFAD2-GUS binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*와 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; SN는 pBinSiFAD2-GUS binary 벡터를 가진 *Agrobacteria* 와 npt II 유전자 (kanamycin 저항성 마커 유전자)내의 primers (Forward primer : 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' 와 reverse primer: 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; V는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*와 nptII 유전자내의 primers(상동)를 사용하여 얻은 PCR 산물로써 nptII primer를 사용한 경우 약 700 bp의 PCR 산물은 얻을 수 있었고, SiW6F1과 SiW6R1등의 유전자 primer를 이용한 경우 약 750bp의 PCR산물을 얻을 수 있었다. 도 4b로부터 pBinSiFAD2-GUS와 pBI121 binary vector가 *Agrobacteria* 내로 도입되었음을 확인하였다.

56> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia) 꽃 조직에 pBinSiFAD2-GUS 혹은 pBI121 binary vector가 각각 도입된 *Agrobacteria*를 2일동안 28 °C에서 진탕 배양한 후, floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal) 에 근거하여 애기장대의 개화직전 암술머리에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시켰다. 도 4c는 도 4b의 pBinSiFAD2-GUS 혹은 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시킨 것을 나타낸 것이다. a는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이고; b는 pBinSiFAD2-GUS binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이다.

57> 형질전환한 결과 kanamycin (30 µg/ml)에 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별하여 식물체의 각 조직으로부터

*Si-FAD2* 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자,  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 도 5는 *Si-FAD2* 유전자 프로모터 하에 GUS가 함유된 binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*를 이용하여 애기장대를 형질전환 시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. (A)는 형질전환 되지 않은 애기장대이고; (B)는 pBI121을 함유한 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이고; (C)는 pBin*SiFAD2*-GUS binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이다.

58> 도 6a는 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 하에 GUS 유전자가 함유된 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 조사하여 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 나타낸 것이다. 종자는 개화 후 발달 단계별 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10 - 15일, 종자3; 개화 후 20 - 25일)로 채취하여 시료로 사용하였다. 도 6b는 pBin*SiFAD2*-GUS binary 벡터 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 조사한 다음, 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 비교하여 나타낸 것이다. 도 5 및 도 6a, b로부터 함께 유래 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터하의 GUS는 애기장대 종자 특이적으로 발현하며 특히 개화 후 10일에서 25일 사이의 발달 종자에서 가장 강한 발현을 나타냄을 확인하였다. 특히, 종자 발달 2기 와 3기에서 그 발현양은 CaMV35S 프로모터에 비해 5배 적게 발현됨을 확인하였다. 이는 함께 유래 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터가 종자 특이적이며, 특히 종자 발달 단계 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 제시한다.

59> (실시예 5) 함께 종자 내 *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 활성 분석

60> 모델 식물체인 애기장대 뿐만 아니라 참깨 종자 내에서 *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 활성을 조사하기 위하여 클로닝된 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 및 GUS reporter 유전자를 함유하는 transient expression vector (p*SiFAD2*-GUS)를 제조하였다. 우선 실시예 4에서 획득한 *Hind*III 와 *Bam*HI 제한 효소 부위를 갖는 *Si-FAD2* genomic 유전자의 프로모터 부위(-660 내지 +141)를 *Hind*III와 *Bam*HI으로 절단한 뒤, 외래 유전자 발현을 일시적으로 볼 수 있는 transient expression vector인 pBI221 (Cat. # 6019-1, Clontech, 미국)에서 CaMV35S 프로모터를 *Hind*III 와 *Bam*HI 제한효소 부위를 이용하여 제거한 다음, 동일한 위치에 삽입하였다. 이로써 *Si-FAD2* genomic 유전자의 프로모터가 삽입된 transient expression vector, p*SiFAD2*-GUS를 제조하였다. 도 7a는 상기와 같이 제조된 transient expression vector(p*SiFAD2*-GUS)를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는  $\beta$ -Glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자(발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, Nos-ter는 nopaline synthase 유전자의 유전자 발현 터미네이터이다.

61> p*SiFAD2*-GUS transient expression vector는 plasmid midi kit (Qiagen, 미국)을 이용하여 plasmid를 추출한 다음, 1.6 $\mu$ m gold particle (Bio-rad, 미국)로 코팅하였다. 한번에 도입되는 DNA와 gold particle의 비율은 2 $\mu$ g DNA/500 $\mu$ g gold particle이었으며, particle bombardment (PDS1000/He gun, Bio-rad) 조건은 1100psi He gas 압력을 사용하였고 27℃에서 18시간 incubation 하였다. *Si-FAD2* 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자, GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 도 7b는 도 7a에서 보여지는 벡터를 참깨의 발달하는 종자에 particle bombardment 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. a는 프로모터가 없는 pBI221 vector이고; b는 CaMV35S 프로모터가 있는 pBI221 vector이고; c는 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터가 있

는 p*SiFAD2*-GUS vector이다. 도 7b를 통해 참깨 유래 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터는 참깨 종자에서도 정상적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 확인하였다.

62> (실시예 6) *Si-FAD2* 유전자 프로모터 안에 종자 특이적 발현에 필수적인 프로모터 활성 단편 및 그의 게놈 유전자에 존재하는 intron을 포함하는 binary 벡터 제조

63> 본 발명의 참깨 *Si-FAD2* 유전자 프로모터 안에서 종자 특이적 발현에 관여하는 프로모터 활성 단편을 분석하고, *Si-FAD2* 유전자 안에 존재하는 intron이 형질전환 식물체에서 외래 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 우선 기존에 특허 출원된 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 프로모터 및 유전자 서열을 이용하여 하기 표 1과 같이 *Hind*III (AAGCTT)와 *Bam*HI (GGATCC) 제한 효소 부위를 포함하는 유전자 특이적 primers를 제조하였다.

64> [표 1]

65>

	Primer name	Sequence	Tm
Forward primer	SIW6F1	5'-CCG AAG GGT CAT ATG TGA AAT GTA ATG GAA AAT GCG AC-3'	72 °C
	SIW6F2	5'-CCG AAG GGT GGG ACA TGC CAC ATT ATG TGG-3'	67 °C
	SIW6F3	5'-CCG AAG GGT GTC CTA ACC AGG TTT GAA CAA CC-3'	67 °C
	SIW6F4	5'-CCG AAG GGT GGA ATG TGC ACA CTC CAT GTG-3'	67 °C
	SIW6F5	5'-CCG AAG GGT GGG CCC CTC CTC AGA CAG G-3'	71 °C
Reverse primer	SIW6R1	5'-CTT GGA TCC TTG GAA GGA GAA ATC GCG TGA AAGCAC-3'	75 °C
	SIW6R3	5'-CAA GGA TCC GTC AAG CCG CCC CCA ATT TAC-3'	68 °C

66> 다음, 참깨의 게놈 DNA를 주형으로 상기 primers를 이용하여 원래의 크기 및 5' 말단부터 일부분이 제거된 프로모터 부위를 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction) 방법으로 확보하였다. 확보된 PCR 생성물을

*HindIII* 와 *BamHI* 으로 절단한 뒤,  $\beta$ -glucuronidase (이하 'GUS'라 약칭함) 유전자를 함유하는 통상의 binary vector인 pBI101 (Cat.# 6017-1, Clontech, 미국)의 *HindIII* 와 *BamHI* 제한효소 부위에 삽입하여 본 발명의 바이너리 벡터(pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)를 제조하였다 (도 8a). 도 8a는 참깨 유래 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터와 유전자 안에 존재하는 intron을 포함하는 binary vector (pSiW6-P2.4)를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는  $\beta$ -glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자 (발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, NPTII는 Neomycin Phosphotransferase II를 코딩하는 kanamycin 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다. 그리고 GUS 리포터 유전자는 삽입된 프로모터와 Nos 터미네이터 (Nos-ter)에 의해 식물체에서 발현된다.

67> 상기 제조된 각각의 binary vector들을 대장균에 도입한 다음, alkaline lysis 방법 (Sambrook et al., 2001)에 의거하여 플라스미드를 추출하여 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI*를 이용하여 절단한 다음 0.7% agarose 겔에서 전기영동하였다(도 8b). 도 8b는 6종류의 binary 벡터들을 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI*를 이용하여 절단한 다음, 0.7% agarose 겔에서 전기영동한 것을 나타낸 것이다. 여기서, pSiW6-P2.4는 유전자특이적 primers SiW6F1 (-660 bp) 과 SiW6R3 (+1743 bp) 에 의해 증폭된 기존의 프로모터부위와 그의 유전자 안에 존재하는 intron을 함유하는 binary 벡터이고, pSiW6-F1는 유전자 특이적 primers SiW6F1 (-660 bp) 과 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터 (이는 기존에 출원된 pBinSiFAD2-GUS와 동일한 binary 벡터임)이고, pSiW6-F2는 유전자특이적 primers SiW6F2 (-547 bp) 와 SiW6R1(+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터이고, pSiW6-F3는 유전자특이적 primers SiW6F3 (-346 bp) 과 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터부위를 함유한



binary벡터이고, pSiW6-F4는 유전자 특이적 primers SiW6F4 (-179 bp) 와 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary벡터이고, pSiW6-F5는 유전자 특이적 primers SiW6F5 (-52 bp) 와 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터이다.

<68> (실시예 7) 제조된 binary 벡터를 이용해서 *Arabidopsis* 식물체의 형질전환

<69> 상기 실시예 6에서 제조된 6종류의 binary 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)과 pBI121 binary 벡터 (Cat.# 6018-1, Clontech, 미국)를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Suh et al., 2002, Molecules and Cells)내로의 도입은 Freeze-thaw 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)에 근거하여 수행하였다. *Agrobacteria* 를 O.D.=0.5가 되도록 YEP 배지에서 현탁 배양한 후, 20 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 현탁한 다음, 7종류의 binary 벡터와 각각 혼합하여 액체질소에 1분간 방치한 후, 37 °C에서 2분간 배양함으로써 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1내로 도입하였다. 각각의 형질전환된 *Agrobacteria*는 2일동안 28 °C에서 진탕 배양한 후, floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia)의 개화직전 암술머리에 접종함으로써 애기장대를 형질전환 시켰다.

<70> 도 9는 도 8b의 6종류의 binary 벡터들과 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 사진이다.

<71> (실시예 8) 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 및 효소학적 분석

<72> 상기 실시예 7에서 제조된 7종류의 애기장대 형질전환체로 부터 종자를 수확한 다음, kanamycin (30 µg/ml)을 함유하는 MS 배지에 도말하여 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별

하였다. 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 각 형질전환 식물체의 조직을 염색하기 위하여, 식물체의 조직은 1mM X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담구어 37 °C에서 12 시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 100% 에탄올을 부가함으로써 조직에 존재하는 클로로필을 제거했다. 또한 GUS의 활성을 정량적으로 조사하기 위하여, Jerrerson et al (EMBO J. 6: 3901-3907, 1987)의 방법에 의거하여 형질전환 식물체의 각 조직을 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium lauroylsarcosine, 그리고 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol을 함유하는 용액에서 마쇄한 다음, 12,000g에서 원심분리하여 상등액을 취했다. 획득된 상등액은 1 mM MUG (4-methylumbelliferyl glucuronide)와 섞어 37 °C에서 반응시킨 다음, 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣어 반응을 종료시켰다. 반응이 종료된 반응액은 fluorometer를 이용하여 365 nm 와 455 nm 파장에서 값을 측정한 다음, 측정된 값은 MUG 표준용액을 이용하여 만든 표준곡선과 비교함으로써 GUS 활성을 계산하였다.

73> 도 10은 상기 7종류의 형질전환된 애기장대의 발달 종자 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10 - 15일, 종자3; 개화 후 20 -25일), 종자를 둘러싼 꼬투리, 그리고 종자로 부터 나온 유식물에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색한 것이다. CaMV35S는 pBI121 binary 벡터에 의해 형질전환된 애기장대이고, SiW6P2.4는 pSiW6-P2.4, SiW6F1는 pSiW6-F1, SiW6F2는 pSiW6-F2, SiW6F3는 pSiW6-F3, SiW6F4는 pSiW6-F4, 그리고 SiW6F5는 pSiW6-F5에 의해 형질전환된 애기장대이다. 도 10의 결과에 의거하면, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 5' 말단 부위에서부터 점차적으로 약 200-150 bp 정도 삭제된 프로모터 부위를 이용하

여도 종자 특이적으로 외래 유전자의 발현을 유도하였다. 뿐만 아니라, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터 (-660/+141)에 이 유전자의 5' UTR (untranslated region)에 존재하는 intron을 삽입하였을 경우 (SiW6P2.4, -660/+1743), 발달하는 종자뿐만 아니라 종자를 둘러싼 꼬투리 및 종자를 받아시킨 유식물체의 자엽에서 외래 유전자의 발현을 확인하였다.

74> 도 11a는 도 10에서 획득된 7종류의 형질전환 애기장대에서 발달하는 종자 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10-15일, 종자3; 개화 후 20-25일) 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 GUS 효소의 활성을 조사한 것이다. 보여지는 GUS 활성도는 각 construct별로 얻어진 10개 형질 전환체 (T<sub>1</sub> 식물체)를 분석하여 얻어진 값이다. 도 11a에서 보면, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 5' 말단 부위에서부터 점차적으로 약 200-150 bp 정도 삭제된 프로모터 부위를 이용하여 형질전환 시킨 식물체를 분석한 결과, SiW6F1 (-660/+141), SiW6F2 (-547/+141), SiW6F3 (-346/+141) 및 SiW6F4 (-179/+141)를 사용하였을 때, SiW6F5 (-52/+141)의 경우보다 개화 후 10 - 25일 사이의 발달하는 종자에서 약 4 -10배 이상의 GUS 활성을 확인하였다. 이로 부터 microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터에서 -179에서 -53 부위의 염기서열이 종자 특이적 발현을 유도하는 핵심 부위임을 알 수 있다. 또한, intron이 포함된 SiW6P2.4 construct (-660/+1743)를 사용한 경우, intron을 포함하지 않은 SiW6F1 (-660/+141)를 사용한 경우보다 개화 후 10 - 25일 사이의 발달하는 종자에서 약 40배 이상, 종자를 둘러싼 꼬투리에서 약 10배 이상의 GUS 활성도가 증가됨을 확인하였다. 이로 부터 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터를 자신의 5' UTR에 존재하는 intron과 함께 사용하였을 경우, 외래 유전자의 발현을 발달하는 종자 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 크게 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

75> 도 11b는 도 10에서 획득된 형질전환 애기장대로부터 수확된 종자( $T_2$ )를 항생제 (kanamycin, 30  $\mu\text{g/ml}$ )를 함유하는 배지에 도말하여 항생제에 저항성을 갖는 형질전환체를 선별한 다음, 발아 후 7일째 되는 유식물체에서 GUS 효소의 활성을 조사한 것이다. 보여지는 GUS 활성도는 각 construct별로 얻어진 5개 형질전환체 ( $T_2$  식물체)를 분석하여 얻어진 값이다. 어린 유식물체에서는 microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터만을 사용한 construct 들 (SiW6F1, SiW6F2, SiW6F3, SiW6F4 및 SiW6F5)에서는 거의 GUS의 활성이 조사되지 않았으나, microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터에 intron이 도입된 construct (SiW6P2.4)에서는 intron이 도입되지 않은 construct (SiW6F1)에 비해 유식물체의 자엽에서 GUS의 활성이 약 30배 이상 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과로부터 기존에 출원된 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 특이적으로 발현시켰으나, 이 프로모터와 그의 유전자 안에 존재하는 intron을 함께 사용하였을 경우, 종자뿐만 아니라 종자의 꼬투리와 발아한 유식물의 자엽 특이적으로 외래 도입 유전자를 발현시킬 수 있음을 알 수 있다.

#### 【발명의 효과】

76> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (Si-FAD2) 게놈 유전자 및 현재까지 밝혀지지 않은 Si-FAD2 유전자 프로모터의 염기서열을 제공하였다. 이러한 Si-FAD2 유전자 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 식물체에서 발현시킨 결과, 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 발현을 유도하는 신규 프로모터임을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공함으로써, 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발

현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체개발에 이용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

서열번호 3의 -179 내지 -53의 활성 단편을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

**【청구항 3】**

제 1항의 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 4】**

제 3항에 있어서, 서열번호 1의 149 내지 1722의 발현증가활성 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 5】**

제 3항에 있어서, 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 6】**

제 5항에 있어서, 도 4a에 도시된 pBinS/FAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 7】**

제 5항에 있어서, 도 8a에 도시된 pSiW6-P2.4인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 8】**

제 3항에 있어서, 상기 프로모터가 트랜전트(transient) 발현 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 9】**

제 8항에 있어서, 도 7a에 도시된 pSiFAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

**【청구항 10】**

제 3항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

**【청구항 11】**

제 3항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터를 식물체에 도입하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법.

【도 1】

[illegible]

## SiW6F1

**SIV6R1**

ATG

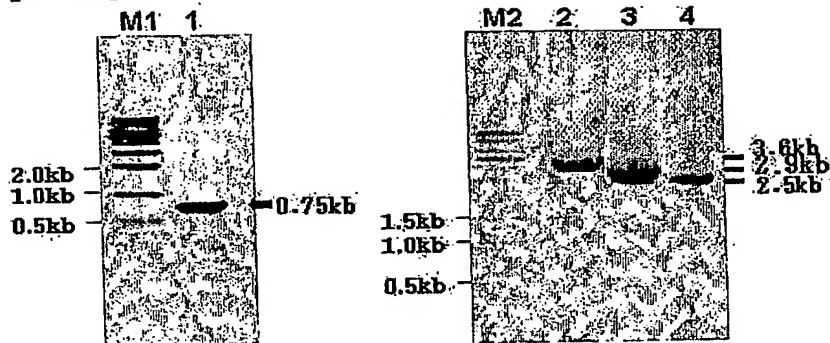
## Exon

W6R3 W6R5

W6R1



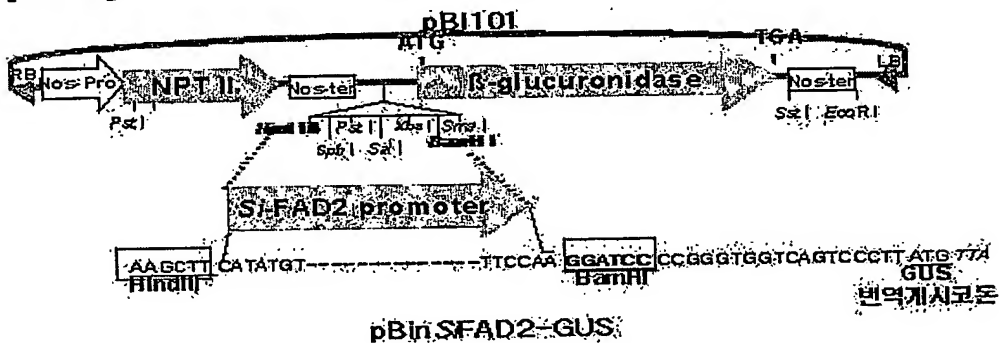
【도 2b】



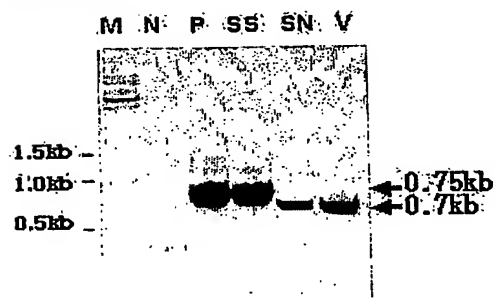
【도 3】

CATATGTAAGATGTAATGGAAGATGCGACAGAGATTCGAATAGAGAGAAATCCAAATTTGACAGAGATTA  
 CATGAAAGAGATTTGTAAGATAGCATATATATGTTAAAGATGAAATGAGACATGCCAGATTATGTTG  
 AATGAAAGAGAGATTTGCTTGGAAATTAATTAAGAGATTAATGTTTACATTATATGTTGATTAAT  
 CACTTTTTTTGAAATTTGATCTATCAGATGACAGTTGATTATATTTGACATATTAATTTGTTTATG  
 TCTAGTCAAGCCTAATTAATTTGTCGGAAGAGACAAATTTTTTTCCTTACAGAGTTTGAACAA  
 CGAAACAAATCAGAAAGAGAGTTGATGAGACTTGGGATGTTGATGCTGCTTTTCTAAATTTGTA  
 TCATTACAGACGAGAACTGATTTGTTCTGCAAGTTCAATTTGAGTTCGGTTGAGCTATTAATTTGCTT  
 AACACAGAAATGTTGAAATTTGACACATCTGATGTTGGGCAATGAGGCGGATGACAGTGGCGGGCAAGTT  
 ACCTCGTTACGTTGAGGCAATGATGAAAGGGGATCTTTTGAAGTGGAGGGGTTGGGGCGGGGGTTG  
 GGGGGGGGGCCCTCCTCAGAGAGGCTATATTTATGAGAGCTCGTAAGGAGAGAGCG

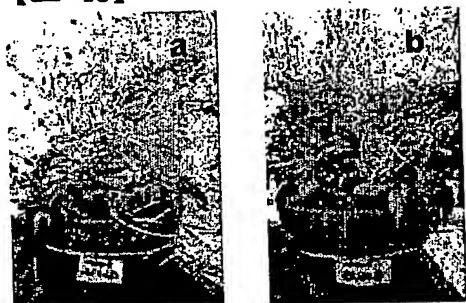
【도 4a】



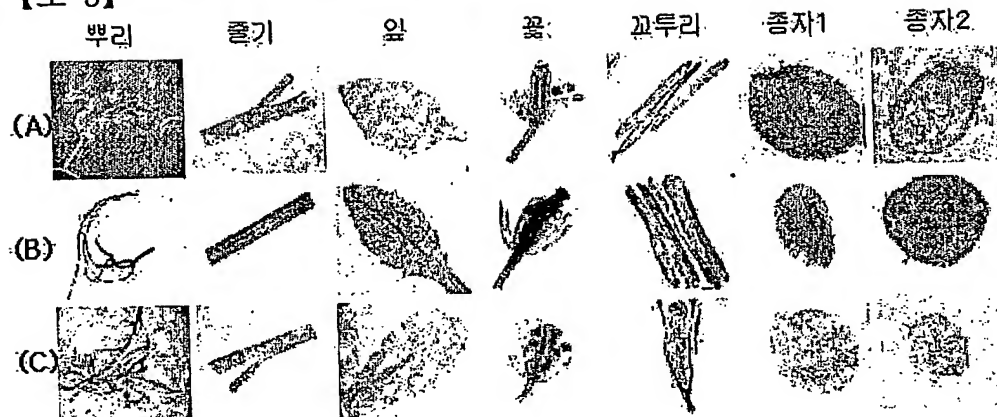
【도 4b】



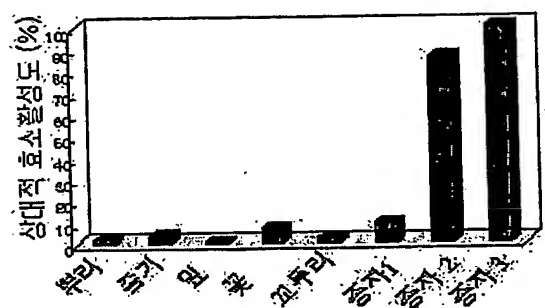
【도 4c】



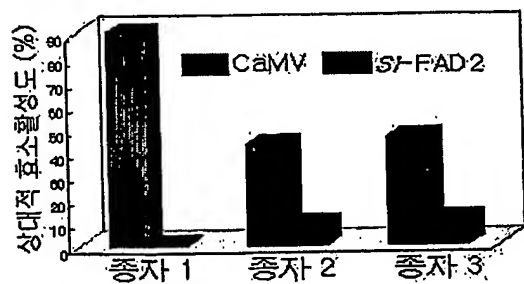
【도 5】



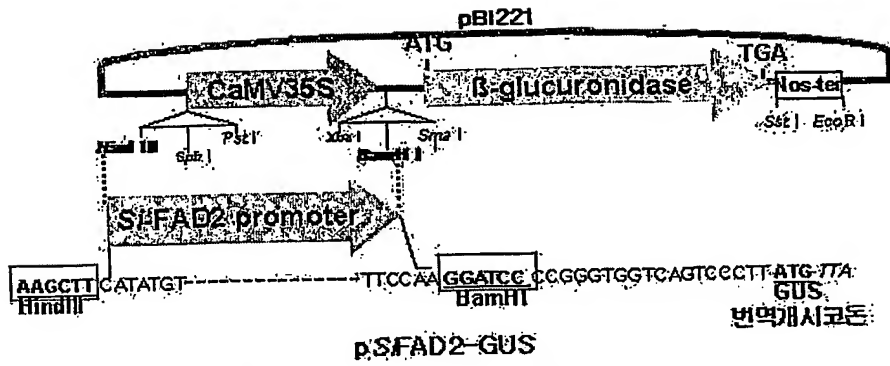
【도 6a】



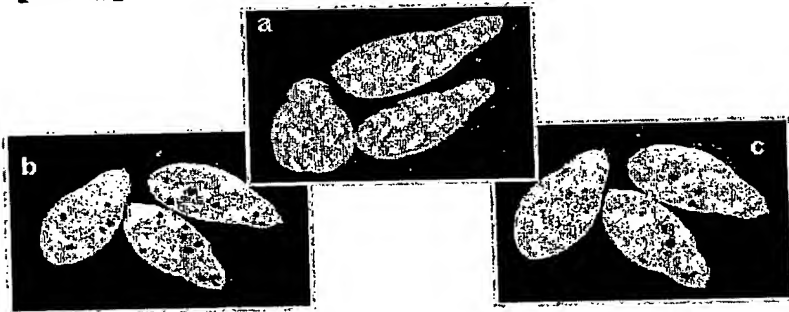
【도 6b】



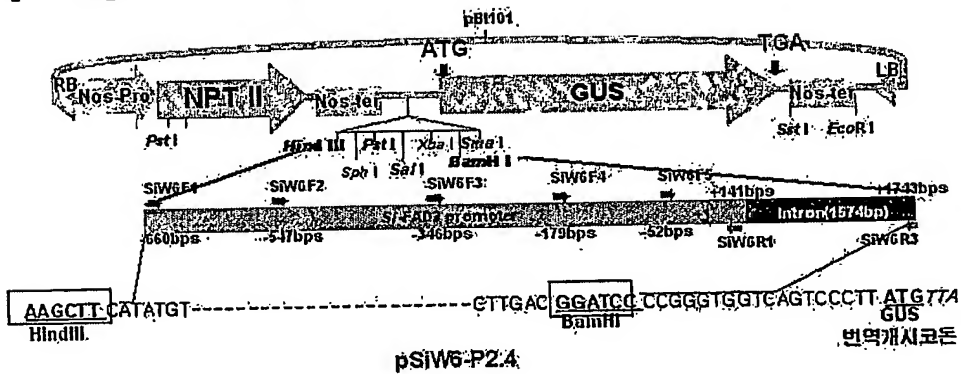
【도 7a】



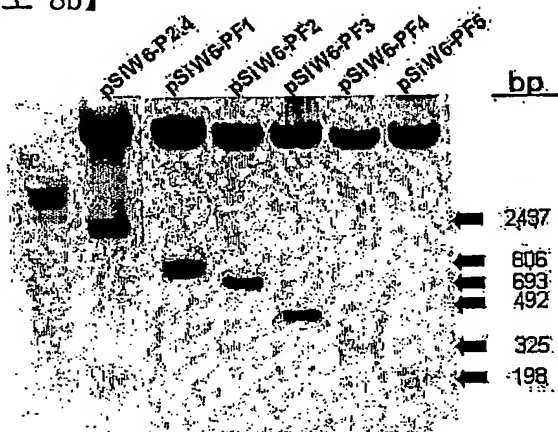
【도 7b】



【도 8a】



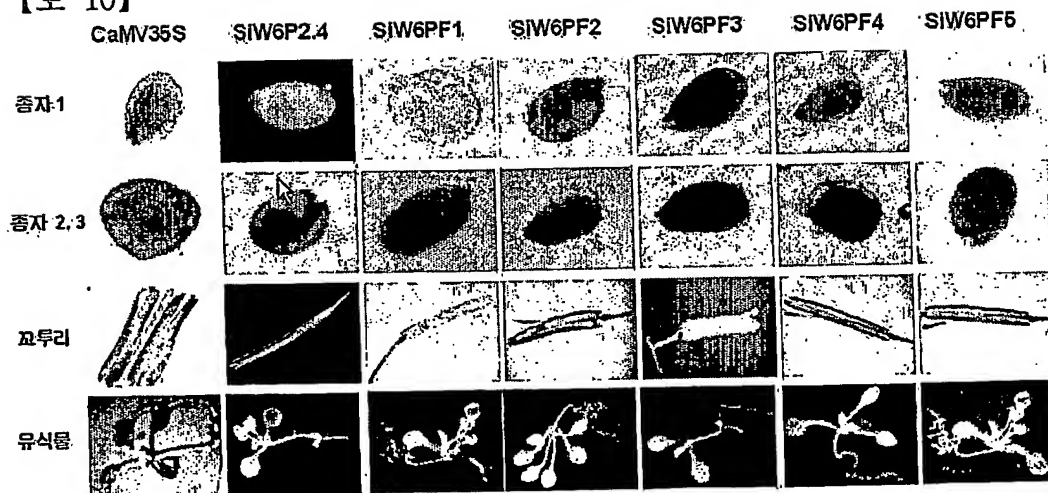
【도 8b】



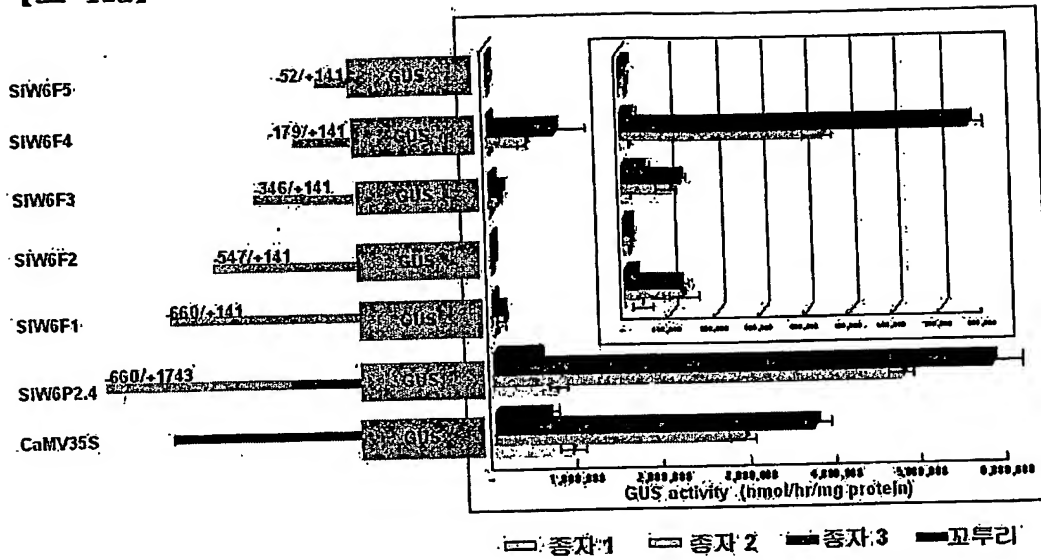
【도 9】



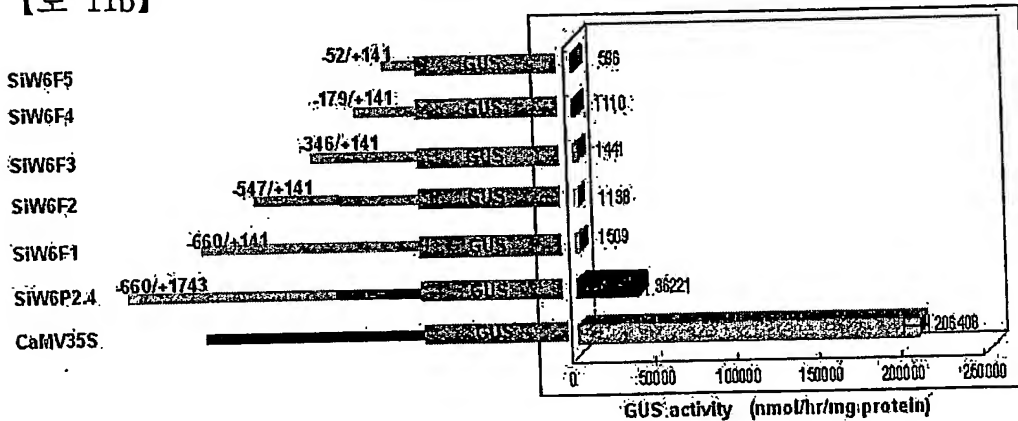
【도 10】



【도 11a】



【도 11b】



【도 12】

```

-179 GGAATGTGCACACTCCATGTGGGCCAATGAGCGGATGACACGTGGCGGG
CAACTTACCTCGTTACGTTGAGGCATGCATGAAAGGGGGATCTCTTGAGGTGGA
GGGGTGGCGCGGGGGTTGGGGGG -53

```

## 【서열목록】

<110> KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION <120> Plant seed-specific  
 expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector  
 comprising the promoter <130> Gn14288 <150> KR 10-2002-0069589 <151>  
 2002-11-11 <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 3102 <212> DNA

<213> Sesamum indicum <220> <221> 5'UTR <222> (1)..(1746) <220> <221>  
 intron <222> (149)..(1722) <220> <221> 3'UTR <222> (2899)..(3102) <400>

1 aacgccactc aaatatttca ccaccaccac caccagaaca ttcagaaaca agaaataaac 60  
 acacacacac tataaaacag ttcttgcgaa agaaggaaag cgcttccgca gaagtgcctt 120  
 cacgcgattt ctctttccaa gttttcaggt aacgtgcccc cttttctctt ctcttctatt 180  
 ctcttttctc ataattcatg atcaatcttt gagtattttg gtgtttgtgt gtctcaagaa 240  
 aaccgcattt ttattttctt gcaatgggtgt ctttatttcc tgtcgttttt ttcagctatt 300  
 aatgttcttt tgatgtagat gaggtttaat cgtatgttct tgagctgcat tacctgatga 360  
 ttcatggatc tgaggaatgt atgcgatttt ttatttttgt tttatttttt ggtgggcttt 420  
 cccaagaaga atctatttgg ggttattctt gtgtggtttg gtgcaaactt ttggatttta 480  
 cgcagtattg gtgtctggac cacatgattg tgtcatttat atttggattt tgtctttatc 540  
 tttgtatgca tgtgggatgc aggaagaaaa aactgtggta aatgtctttg aagagattga 600  
 tttagcatat atacaagggt gcctgggctt cagttttgat gattttgatg tacattgtgg 660  
 agatttgatg ggttgcattg ggctcaaact ttcttgtaag atttgttttt tgtccaaaaa 720  
 atttgggatt ttccacttt tattgaacag tagatctttt cctgtttcaa cccaaaagtt 780  
 atttcgggtt gaagttttac atcatagata taattagtaa taaatttcgg ttaggtccgt 840  
 aaagaatcat taattacatc aattaatatt gttaaatgta caaaaagagg gaatttatgg 900  
 tgatatctat gaagccatgc tatgcctggc tggaattccg tcgatgaaaa agacagattc 960  
 cgggtgtgtg tagatttcac tgtagtgaa taccctactt caaagaacgg tgctgattca 1020  
 actgctctag tcctcaggat tttagtacta cttgtttgct gtttgaaca catggctgaa 1080  
 aataaatgtc tgcttttcga ccttggcgct tagagaattt actaccacat ctcattttta 1140

gcatcccaac gatgatttct gctgtcagaa tgaatgaatt gactaagagc aactcggtta	1200
tttgagattg aattggttgt ttgtgattgt tgttgatttg tttttgtcgt tatgatcttt	1260
tgaggtattc gccatacaat gctgatacta gtcgttgtga ttttccggta tatgtatttg	1320
tgacgtatcg ttctgtagtt tggtaactaa tagaatgcat gtggtggtaa ctaatagaat	1380
gcatgttgta gtaacaaatg cacattgtag attctcgtgg atttttcggg tgttcgttac	1440
cagcacattg ccgattctgg tatgattttt gtcgtgttca ttgtttagtt gcctttcttg	1500
gctgccacta tticattgag aatgtaggac gttgttcgat gcaaaagaac ttttgccgac	1560
tagaatgcag gtggcaatct ggaatctcct attatgggag gaactactgt aattgggagg	1620
ttttgattca gacaatctag taacagtcta gaagctactt tgcctttaaa tctcaatgac	1680
cttaaacgcc atgatggaga catttgaatc catgttttgc aggtaaattg ggggcggctt	1740
gacaaaatgg gagccggagg acgcatgtct gatccaacaa cgaaagacga acaaaagaag	1800
aacccctcc aacgggtgcc ttacgcaaag cctccattca cactcggta catcaagaag	1860
gccattccac cacactgctt cgagagatcc gtcagccgtt cgttctccta tgtcgtttac	1920
gatctcgtca ttgttttctt tctctactac attgcgactt ctacttcca tctgctgcca	1980
tccccatact gctacctagc ttggcccatt tactgggctg tacaaggctg cgtttgcacc	2040
ggaatctggg tcattgcca tgaatgtggc caccatgcat tcagcgatta ccagtggctt	2100
gacgacacag ttggcctcat cctgcactct gccctgctcg tgccttattt ctcatggaaa	2160
tacagccacc gccgccacca ctccaacact ggatcccttg agcgtgacga agtcttcgtc	2220
ccaaagccaa aatccagagt ctctgtgttac tccaaatact tgaacaatcc acttggcaga	2280
gtcatcacac ttgtgggttac tcttactctc ggttggcctc tatacttgct gttaaatgtc	2340
tctggcaggc cttacaaccg ttttgcattg cactttgacc catatggtcc aatatataat	2400



gaccgtgaga gacttcaa	attctctcc gatgctg	gta taattgctgc	tgtatgtgtg	2460
ctttatcgtg ttgctttg	gt caaagggttg	gcttggctgg	tatgtgttta	tggggtaccg 2520
ttactcattg tcaacggtt	tccttgtttg	atcacattcc	ttcagcacac	tcacccttcg 2580
ttgccgcact atgattcttc	cgagtgggac	tggctaagg	gagctcttgc	aactgtcgac 2640
agagattatg gggtgctaaa	taagggtgttc	cataacatca	cagatacgca	cgtgactcac 2700
caccttttct caacgatgcc	acattacat	gcaatggagg	caactaaggc	aatcaagccc 2760
atactgggcc agtattatca	gtttgatgga	accccgtttt	acaaggcgat	gtggaggggag 2820
gcaaaggaat gtctgtatgt	cgagccagac	gagagtactc	cagacaagg	tgtattctgg 2880
tacaagaaca agttctgaag	ccgaataaca	tgtggttagt	gaaaatggcg	tcttcttatt 2940
ttgtcctatg gagatggagg	aacatcatca	tgttttcttt	ttcttcttat	aagatgcgtc 3000
ctttgttagt gtattctctg	catgtaataa	aataaacttc	tacccgaaac	cttgtctgtg 3060
ctggtcggat tctagtctctg	caataaattg	tcaagtttag	tg	3102 <210>

2 <211>	383 <212>	PRT <213>	Sesamum indicum <400>	2 Met Gly Ala Gly Gly
Arg Met Ser Asp Pro Thr Thr Lys Asp Glu Gln	1	5	10	
15 Lys Lys Asn Pro Leu Gln Arg Val Pro Tyr Ala Lys Pro Pro Phe Thr			20	
25	30 Leu Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Glu Arg			
Ser	35	40	45 Val Ser Arg Ser Phe Ser Tyr	
Val Val Tyr Asp Leu Val Ile Val Phe	50	55	60	
Leu Leu Tyr Tyr Ile Ala Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Pro Ser Pro	65			
70	75	80 Tyr Cys Tyr Leu Ala Trp Pro Ile Tyr Trp		
Ala Val Gln Gly Cys Val	85	90	95	



Cys Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe 100  
 105 110 Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His  
 Ser 115 120 125 Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe  
 Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His 130 135 140  
 His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys 145  
 150 155 160 Pro Lys Ser Arg Val Ser Trp Tyr Ser Lys  
 Tyr Leu Asn Asn Pro Leu 165 170 175  
 Gly Arg Val Ile Thr Leu Val Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu 180  
 185 190 Tyr Leu Leu Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asn Arg Phe Ala  
 Cys 195 200 205 His Phe Asp Pro Tyr Gly Pro  
 Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln 210 215 220  
 Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Ile Ala Ala Val Cys Val Leu Tyr 225  
 230 235 240 Arg Val Ala Leu Val Lys Gly Leu Ala Trp  
 Leu Val Cys Val Tyr Gly 245 250 255  
 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe Leu 260  
 265 270 Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp  
 Asp 275 280 285 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala  
 Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu 290 295 300  
 Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Thr His His Leu 305  
 310 315 320 Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met  
 Glu Ala Thr Lys Ala Ile 325 330 335

Lys Pro Ile Leu Gly Gln Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Phe Tyr 340  
 345 350 Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Pro  
 Asp 355 360 365 Glu Ser Thr Pro Asp Lys Gly  
 Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Phe 370 375 380  
 <210> 3 <211> 660 <212> DNA <213> Sesamum indicum <220> <221>  
 promoter <222> (1)..(660) <223> promoter of microsomal oleic acid desaturase  
 coding gene <400> 3 catatgtgaa atgtaatgga aatgcgaca agaattgcaa tagagaaaat  
 ccaatttgca 60 gagattacat gaaaagaatt tgtacaaata gcatatatat gttaaaatga  
 aatgggacat 120 gccacattat gtggaataaa aaagacaatt tgcttggaat taattataga  
 ataaatgtgt 180 tacatttaat atgtgattaa tcactttttt tgaattgtac atctatcaca  
 tgacaagttc 240 attataatttg acatataatt tgtttatgtc tagtcaagcc taattaaatt  
 tctcggaag 300 cacaaaattt tttgtccta accaggtttg aacaacaaa caaatcaca  
 agcaggtgta 360 tcgcacttgc gatgtgatcg gtcacttttt ctaaattgta catcattcac  
 acgacaactg 420 tattgtgctc caagttcaat tgagtgcggt tggagctata atttccttga  
 acacacaatg 480 tggaatgtgc aactccatg tgggccaatg agcggatgac acgtggcggg  
 caacttacct 540 cgttacgttg aggcatgcat gaaaggggga tctcttgagg tggaggggtg  
 ggggcggggg 600 ttgggggggg gccctcctc agacaggtct atatttatga gacctcgtaa  
 ggcagaacgc 660  
 660

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**